Method for Quantitative Determination of Cerebroside in "Plant Ceramide" Foodstuffs by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection

Minoru KASHIMA^{*1}, Kiyotaka NAKAGAWA^{*2}, Tatsuya SUGAWARA^{*2},
Teruo MIYAZAWA^{*2}, Chiaki MURAKAMI^{*3}, Rumiko MIYASHITA^{*4},
Jisaburo ONO^{*4}, F.S. DESCHAMPS^{*5,*6} and P. CHAMINADE^{*6}

^{*1} Food Research Laboratory, NOF CORPORATION
(18-11, Toshima, 4-Chome, Kita-Ku, Tokyo 114-0003, JAPAN)

^{*2} Graduate School of Agriculture, Tohoku Univ.
(Tsutsumidori Amamiyamachi 1-1, Sendai 981-8555, JAPAN)

^{*3} JAPAN INSTITUTE OF OILS & FATS, OTHER FOODS INSPECTION(FOUNDATION)
(3-27-8, Nihonbashi-hamacho, Chuo-ku, Tokyo 103-0007, JAPAN)

^{*4} CENTRAL LABORATORY NIPPON FLOUR MILLS CO., LTD.
(5-1-3 Midorigaoka, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0041, JAPAN)

^{*5} Laboratoires LAVIPHARM
(23, Avenue de Neuilly, 75116 Paris, FRANCE)

^{*6} Laboratoires de Chimie Analytique, Faculte de Pharmacie, Universite Paris Sud
(Rue J.B. Clement, 92290 Chantenay-Malabry, FRANCE)

Edited by H. Shimasaki, Teikyo Univ., and accepted December 7, 2001 (received for review October 1, 2001)

Abstract: Normal-phase high performance liquid chromatography was developed with evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD) for determining cerebroside (monoglycosylceramide) present in commercially available "Plant ceramide". Authentic cerebroside, isolated from wheat flour by preparative HPLC, served as the standard. A standard curve was obtained for what at 1 to 40 μ g of cerebroside, the equation for which was $y=ax^b$ (x : cerebroside weight; y : peak area). The regression correlation coefficients was above 0.997. Prior to making determination, food samples were saponified so as to remove glycerolipids, and thus improve the precision of cerebroside. Determination on three foodstuffs each containing cerebroside, the present method was conducted and evaluated has on the resulted. Statistically significant intra- and inter-laboratory variation in the data were analyzed. The present HPLC-ELSD was shown quite effective for accurately determining cerebroside content in "Plant ceramide" food samples.

J. Oleo Sci., **51**, 347-354 (2002).

Key words: cerebroside, evaporative light scattering detection

1 緒 言

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド塩基を構成成分とする脂質の一群で、動植物界に広く分布する。植物スフィンゴ脂質には、セラミド、セレブロシド（モノグリコシルセラミド; **Fig. 1**）、オリゴグリコシルセラミド、フィ

トグリコリピドなどがある。このうち、分布量の多い代表的な植物スフィンゴ脂質はセレブロシドである。

これまでに植物セレブロシドには、発芽促進 (1)、水浸ストレス性潰瘍への抵抗性 (2)、海洋生物の付着忌避 (3)、カルシウムイオン透過の促進 (4) などの生物活性が報告されている。最近では、皮膚の角質層に含まれるスフィンゴ脂質の含量と肌荒れに逆相関が報告されている (5)。スフィンゴ脂質は、皮膚内部からの水分蒸散を

Cerebroside (8-sphingenin is combined with C₁₆ hydroxyl fatty acid)

Fig. 1 Chemical Structure of Cerebroside.
(Monoglycosylceramide)

防止すると考えられている。そこで、セレブロシドなどがハンドクリームにスキンケア因子として添加され市販されるようになった (6)。また、食品分野においては、セラミド関連製品の美容分野へのニーズが高まり、抗エラスターゼ作用や活性酸素消去能などの効果を期待して、セレブロシドを配合した一般食品や飲料なども販売されはじめた。このように、“植物セラミド配合”と記された各種のセレブロシド含有製品が、広く市場展開されるようになってきたが、製品中のセレブロシド含量の測定については特定の方法が無く、その含量保証を行うことが大きな課題であった。

植物セレブロシドの定量に使用する標準物質となり得るような高純度なものは市販されていない。従来、セレブロシドの定量は、薄層クロマトグラフィー (TLC) やシリカゲルカラムクロマトグラフィーでセレブロシドを分離した後に、その構成成分を発色定量する方法 (7-13) や TLC-デンシトメトリー法 (14) で行われてきた。しかし、これらの定量操作は煩雑で、再現性の良い値を得るためには熟練を要し、多検体分析が必要な製品中の定量法としては応用しにくい。一方、最近では光散乱検出器 (evaporative light scattering detector; ELSD) を用いた高速液体クロマトグラフ (HPLC) が、脂質分析に応用されはじめた (15-23)。この HPLC-ELSD 法は、移動相の影響を受けないのでベースラインの変動が無く、脂質クラス分離に有効なクロロホルムが使用できる利点がある。筆者らは、48 種類の野菜の主要な糖脂質 (ステリルグルコシド、セレブロシド、モノガラクトシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロールなど) の組成と含量を HPLC-ELSD で明らかにした (23)。この方法は、セレブロシド以外の糖脂質のピーク形状は全て良好であったが、セレブロシドのみ分子種の影響でピークトップが分割していた (23)。この研究では、野菜中の各種の糖脂質の一斉分析が目的であったため、セレブロシドはこの状態で検出せざるを得なかった。しかし、セレブロシドのみを分析対象とするのであれば、分析条件のさらなる検討により、セレプロ

シドを単一ピークとして溶出させることは十分に可能と考えられた。そこで、HPLC-ELSD 法による分析精度の優れたセレブロシド定量法を確立しようとした。

本研究では、はじめに小麦抽出物からセレブロシドを単離し、これを標準物質に使用して、HPLC-ELSD による植物セレブロシドの定量法を確立しようとした。次いで、3 種の“植物セラミド”製品について、ここで確立された分析プロトコールに基づいた 5 機関による共同分析を行い、本法がセレブロシドの公定分析法として妥当であるかを検討した。

2 実 験

2.1 試料

実験に使用した試薬や溶媒は、すべて特級品あるいは HPLC グレードのものをを用いた。

2.2 セレブロシド標準品の調製と構造解析

セレブロシド標準品は、市販の小麦抽出物 (ニッサン N-セラミド; 日本油脂株式会社製) から調製した (Fig. 2)。

小麦抽出物 10 g を 500 mL のメタノール性 0.4M KOH に溶かし、37℃で 4 時間インキュベートしてグリセロ脂質を分解した。反応液にクロロホルム 900 mL と水 290 mL を加えて分配し、アルカリ安定脂質の画分をクロロホルム層から回収した。ここで、この全クロロホルム層をクロロホルム-メタノール-水 (3:48:47, v/v) 500 mL で 2 回水洗して、水洗後のクロロホルム層を濃縮した。上記の小麦抽出物からの溶剤抽出操作を 14 回繰り返して、最終的に小麦抽出物 140 g からセレブロシド濃縮物 17g を得た。これを 300 mL のヘキサソール-イソプロピルアルコール (7:3, v/v) に溶解して、-20℃に一晩放置した。生じた結晶をろ過して除き、ろ液を濃縮した。得られた濃縮物をクロロホルム-メタノール (9:1, v/v) に溶解して 45 mL とし、15 mL ずつを以下の分取 HPLC に 2 度供して保持時間 200~250 分のセレブロシド画分を得た。HPLC のカラムには、タイソーゲル (IR-60-10/40, 70 × 500 mm, 東ソー株式会社製) を用いた。溶出溶媒にはクロロホルム-メタノール (9:1, v/v) を使用し、50 mL/min の流速とした。得られたセレブロシド画分をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー法により精製し、最終的に 140 g の小麦抽出物からセレブロシド 1 g を得た。なお、シリカゲルカラムクロマトグラフの充填剤にはワコーゲル C-100 (150 g, 和光純薬株式会社製) を用い、セレブロシドの溶出にはクロロホルム-メタノール (9:1, v/v) を使用した。得られたセレブロシドの構造と純度を electrospray ionization time of flight mass spectrometer (ESI/TOF MS; Mariner

PerSeptive Biosystem, Frammingham, MA, USA) (23) と TLC (14) で確認し、これを以下の分析の標準品に使用した。ESIMS の条件は、試料注入量を 800ng, 溶媒をクロロホルム/メタノール (2:1, v/v), 流速を 100 μ L/min とした。

2.3 HPLC-ELSD によるセブレロシドの分析

前記で調製したセブレロシド標準品 20 mg を 10 mL のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) に溶解し、これを標準液に用いた。この標準液を適宜希釈し、セブレロシドとして 1~40 μ g を HPLC-ELSD に供した。カラムにはシリカカラム (Inertsil Sil 100-5, 4.6 $\times$ 150 mm, GL サイエンス社製) を用い、光散乱検出器 (Alltech 500 ELSD, Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, USA) でセブレロシドを検出した。溶出溶媒には、クロロホルムとメタノール-水 (95:5, v/v) の 2 液によるグラジエントを用いた。(Table 1) カラム温度は 35 $^{\circ}$ C, 流速は 1 mL/min, ドリフトチューブ温度は 85 $^{\circ}$ C, ガス流量は

3.2 SLPM であった。

2.4 “植物セラミド” 製品のセブレロシドの定量

“植物セラミド” として、2 種類の小麦抽出物製品と 1 種類の小麦胚芽抽出物製品を分析した。これらの試料 500 mg をメスフラスコに取り、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を加えて 50 mL とした。この溶液 2

Table 1 Elution Program for Gradient System in HPLC-ELSD.

Time(min)	A	B
	(%)	
0	99	1
15	75	25
20	10	90
25	99	1

Solvents: (A)chloroform; (B)methanol-water (95:5, v/v)

Fig. 2 Preparation of Cerebroside Standard.
Each Symbol of (× 14) etc. Shows Operation Times.

mLを採取し、窒素ガスにより溶媒を除去した。これにメタノール性0.4N KOHを2 mL加え、超音波処理により均一な溶液にした。これを37℃で2時間インキュベートした後、クロロホルム4 mLと水1.5 mLを加えて混和した。反応液を遠心分離(3000 rpm, 10 min)して、下層のクロロホルム層を採取した。なお、残った上層にクロロホルム4 mLを加え同様の抽出操作を2回繰り返した。得られた下層(クロロホルム層)を集め溶媒を除去し、乾固した抽出物を2 mLのクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)に再溶解した。この溶液20 μ LをHPLC-ELSDに供し、セレブロシドを定量した。なお、“植物セラミド”製品を従来法(TLC-デンシトメトリー法(14))で分析し、HPLC-ELSD法による結果と比較した。測定値は、平均値 $\pm$ 標準偏差($n=3$)で表した。

2.5 共同分析

共同分析は、東北大学大学院農学研究科機能分子解析学分野、財団法人日本食品油脂検査協会、日本製粉株式会社中央研究所、ラボラトワール・ラビファルム社/パ

リ大学南校薬学部分析化学研究所、日本油脂株式会社食品研究所の5機関で行った。これらの機関に、セレブロシド標準品と3種の“植物セラミド”製品を分析用として供し、前述のプロトコールに基づいて定量分析を行った。なお、これらの機関が実験に使用したHPLC装置とELSD検出器の名称をTable 2に示した。

2.6 統計処理

測定値は、平均値 $\pm$ 標準偏差($n=5$)で表した。5機関の共同分析データは、Dixon検定に供した。

3 結果と考察

3.1 セレブロシド標準品の調製

“植物セラミド”製品に含まれるセレブロシドを定量するため、はじめにセレブロシド標準品を調製した。今回、このセレブロシド標準品は小麦抽出物(ニッサンN-セラミド)から調製した。この小麦抽出物は、糖脂質とリン脂質を主成分とする脂質粉末製品であり、セレブロシドの調製に適した素材と考えた。ただ、小麦抽出

Table 2 HPLC and ELSD Equipments Used by Collaborators.

Laboratory	Pump	ELSD detector
A	JASCO PU-980 (Japan Spectroscopic Co.)	SEDEX Model 55 (Sedere)
B	HITACHI L-7100 (Hitachi, Ltd.)	PL-EMD (Polymer Laboratories)
C	LC-10AT VP (Shimadzu, CO.)	PL-ELS (Polymer Laboratories)
D	Bio-tek 525 (Bio-Tek)	SEDEX Model 55(Sedere)
E	JASCO PU-980 (Japan Spectroscopic Co.)	Alltech 500 ELSD (Alltech Associates, Inc.)

Fig. 3 ESI/TOF MS Analysis of Cerebroside Standard.

物には、スフィンゴ脂質とともにグリセロ脂質とが共存していたので、はじめにグリセロ脂質をアルカリ分解して除去し (24), セレブロシドをアルカリ安定な脂質画分として濃縮した。この濃縮物をヘキサン-イソプロピルアルコール (7:3, v/v) に溶かすと、ステリルグリコシドが沈殿し、これを冷却沈殿法により除去した。次いで分取 HPLC 操作を 2 回行い、高濃度にセレブロシドを含有する画分を得た。しかし、この画分には、僅かではあるが遊離脂肪酸が混在した。そこで、このセレブロシド濃縮画分を、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して脂肪酸を除き、セレブロシドを単離した。ESI/TOF MS 分析により、ここで単離されたセレブロシドは、主に 2 種の分子種 (8-スフィンゲニン骨格に C16 あるいは C20 の飽和ヒドロキシ脂肪酸が結合した分子種) からなることがわかった (Fig. 3)。また、この精製セレブロシド画分には、それ以外の脂質の混入は全く認められなかった (Fig. 3)。精製品を TLC に供すると、セレブロシドのスポットのみが検出された (Fig. 4)。

これらの結果から、本法で単離したセレブロシドは高純度に精製されたものであり、セレブロシド定量のための標準品に十分に利用できることがわかった。ちなみに、本調製法 (Fig. 2) では、140 g の小麦抽出物から 1 g のセレブロシド標準品を得ることができた。これまでに、純度の高いセレブロシドをグラム単位で単離した報

告例はない。本法は簡便な植物セレブロシド調製法として今後の利用が期待される。

3.2 セレブロシドの HPLC-ELSD 分析

セレブロシド標準品が得られたので、次に HPLC-ELSD でセレブロシドを定量するための分析条件を検討した。“植物セラミド”製品に含まれるセレブロシドは、多くの分子種からなることが知られている (14)。しかし、通常の HPLC でセレブロシドを分析しようとする、その分子種の影響によりピークの形状がブロードになったり、あるいはピークトップが割れてしまうことがある (23)。ピークの形状が歪めば、定量値の信頼性は下がる。そこで様々な分析カラムを検討した結果、シリカカラムである Inertsil Sil 100-5 を使用すれば、2 液グラジエントを用いることでセレブロシド標準品をほぼ単一ピークとして溶出できることを認めた (Fig. 5A)。セレブロシド標準品 (1~40 μ g) を HPLC-ELSD で分析すると、その分析量 (x) とピーク面積 (y) には累乗関数 ($y=ax^b$) で近似した場合、良好な相関関係が認められた (Fig. 6)。

なお、この検量線は光散乱検出器に Alltech 500 ELSD を使用した時の場合であり、分析量を 25 μ g 以上では近似曲線と実測値のずれがでたが、25 μ g 以下では実測値が近似曲線上にプロットされた。他の光散乱検出器を用いた場合でも、この傾向が認められたが、装置に

Fig. 4 TLC of Cerebroside Standard.

Developing solvent: chloroform:methanol:acetic acid (95:10:2, v/v).

Spotted Amount; 5 μ L, Color-Producing Reagent; 50% H_2SO_4 .

Fig. 5 ABC HPLC-ELSD Chromatogram of Cerebroside Standard and "Plant ceramide" Foodstuffs.

よっては、40 μg 近くの分析量においても近似曲線と実測値のずれが小さいかった。以上のことを考慮し、本実験で測定に供した試料は、グリコシルセラミドの分析量を2~10 μg とした。ちなみに、これらを1次関数で近似した場合は、セラブロシドの分析量とピーク面積は狭い範囲でしか直線性が認められず、セラブロシドの定量値がばらつく原因になった。なお、本 HPLC-ELSD 法のセラブロシドの最小検出量は0.5 μg であった。

3.3 “植物セラミド” 製品への応用

“植物セラミド” 製品からのセラブロシドの抽出は、弱アルカリ分解を応用して行った。“植物セラミド” 製品をアルカリ処理しない場合でも、セラブロシドを効率良く抽出できたが、このアルカリ未処理の抽出物を HPLC-ELSD に供すると、保持時間12分に明瞭なセラブロシドのピークが検出されるものの、このピークは他のグリセロ脂質のピークと重なり定量が困難であった (Fig. 5B)。一方、アルカリ処理で試料のグリセロ脂質を分解してから脂質抽出したサンプルでは、セラブロシドのピークは他のピークと良く分離され、セラブロシドのピーク面積を容易に算出することができた (Fig. 5C)。

したがって、本定量法では試料をアルカリ処理してからセラブロシドを抽出する方法を採用した。3種類の“植物セラミド” 製品を HPLC-ELSD で分析すると、

0.29~4.65% (w/w) の濃度でセラブロシドが含まれていることがわかった (Table 3)。これらの定量値は、従来の TLC-デンストメトリー法で測定した値とほぼ一致した (Table 3)。また、“植物セラミド” 製品 500 mg に、この製品中のセラブロシド含量に相当する 20 mg のセラブロシド標準品を添加して HPLC-ELSD 分析を行うと、セラブロシドの回収率は $101.4 \pm 0.6\%$ ($n=5$) となった。これらの結果からも本法がセラブロシドの含量分析に有効であることが示された。

Fig. 6 Calibration Curve of Cerebroside in HPLC-ELSD.

Table 3 Cerebroside Concentrations in Commercially Available "Plant ceramide" as Determined by HPLC-ELSD and TLC-densitometry Methods.

Samples	HPLC-ELSD	TLC-densitometry
	% (w/w)	
1	4.65 ± 0.10	4.35 ± 0.21
2	2.37 ± 0.11	2.17 ± 0.24
3	0.29 ± 0.03	< 0.5

Samples 1 and 2 are wheat extracts, and 3 is wheat germ extract.

Table 4 Cerebroside Concentrations in "Plant ceramide" as Determined by 5 Laboratories.

"Plant ceramide" foodstuffs	Laboratory					Total ave.	C.V. (%)
	A	B	C	D	E		
	% (w/w)						
1	4.40 ± 0.13	4.32 ± 0.17	4.25 ± 0.12	4.10 ± 0.12	4.85 ± 0.09	4.38 ± 0.28	6.48
2	2.13 ± 0.19	2.20 ± 0.13	2.08 ± 0.10	2.25 ± 0.20	2.44 ± 0.07	2.22 ± 0.14	6.29
3	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.32 ± 0.02	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.03	10.47

Samples 1 and 2 are wheat extracts, and 3 is wheat germ extract.

3.4 公定化に向けて

ここで開発した HPLC-ELSD 法がセレブロシドの公定分析法として妥当であるかを評価するために、5 機関による共同分析を行った (Table 4)。各機関から得られたデータを Dixon 検定に供したが、異常値は認められなかった。3 種類の "植物セラミド" 製品のセレブロシド定量値の変動係数は、6.3~10.5% の範囲であった。これらの変動係数は、各機関における光散乱検出器や HPLC 装置の種類の違いを考慮すれば良好な値であると考えられ、本法を市販 "植物セラミド" 製品中のセレブロシドの定量法として公定化することは十分に可能と考えられた。

4 総 括

近年、食品分野において、セラミド関連製品の美容分野へのニーズが高まっており、"植物セラミド配合" と記された各種セレブロシド含有製品が、広く市場展開されるようになってきた。しかし、製品中のセレブロシド含量の測定については特定の方法が無く、その含量保証を行うことが大きな課題であった。

本研究では、分取 HPLC で単離調製した高純度なセレブロシドを標準物質に用いて、"植物セラミド" 製品中に含まれるセレブロシドの定量法を HPLC-ELSD 分析により確立し、共通試料について合同実験することにより本法の有用性を明らかにした。

References

- Kawai, G., Ohnishi, M., Fujino Y. & Ikeda, Y. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 779-784.
- Okuyama, E. & Yamazaki, M. (1983) *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2209-2219.
- Yoshioka, A., Etoh, H., Yagi, A., Sakata, K. & Ina, K. (1990) *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3355-3356.
- Shibuya, H., Kawashima, K., Sakagami, M., Kawanishi, H., Shimomuro, M., Ohashi, K. & Kitagawa, I. (1990) *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2933-2938.
- Imokawa, G. (1995) *J. Jpn Oil. Chem. Soc. (J. Oleo Sci.)*, **44**, 751-766.
- Yahagi, K. & Iwai, H. (1996) *J. Jpn Oil. Chem. Soc. (J. Oleo Sci.)*, **45**, 1133-1143.
- Galliarad, T. (1968) *Phytochem.*, **7**, 1907-1914.
- Galliarad, T. (1968) *Phytochem.*, **7**, 1915-1922.
- Walter, W.M., Jr., Hansen, A.P. & Purcell, A.E. (1971) *J. Food Sci.*, **36**, 795-797.
- Kinsella, J.E. (1971) *J. Food Sci.*, **36**, 865-866.
- Wade, N.L. & Bioshop, D.G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.*, **529**, 454-464.
- Weber, E.J. (1979) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 637-641.
- Fujino, Y. & Ohnishi, M. (1983) *J. Cereal Sci.*, **1**, 159-168.
- Uwasaza, A., Nakayama, M., Ohnishi, M., Arai, M., Sugawara, T. & Ito, S. (1997) *Res. Bull. Obihiro Univ.*, **20**, 199-206 (1997).
- Lutzke, B.S. & Braughler, J.M. (1990) *J. Lipid Res.*, **31**, 2127-2130.
- Juaneda, P., Rocquelin, G. & Astorg, P.O. (1990) *Lipids*, **25**, 756-759.

17. Melton, S.L.(1992) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 784-788.
 18. Conforti, F.D., Harris, C.H. & Rineharat, J.T. (1993) *J. Chromatogr.*, **645**, 83-88.
 19. Caboni, M.F., Menotta, S. & Lercker, G. (1994) *J. Chromatogr.*, **A683**, 59-65.
 20. Olsson, N.U., Harding, A.J., Harper, C. & Salem, N., Jr. (1996) *J. Chromatogr.*, **B683**, 213-218.
 21. Picchioni, G.A., Watada, A.E. & Whitaker, B.D.(1996) *Lipids*, **31**, 217-221.
 22. Homan, R. & Anderson, M.K. (1998) *J. Chromatogr.*, **B708**, 21-26.
 23. Sugawara, T. & Miyazawa, T. (1999) *Lipids*, **34**, 1231-1237.
 24. Dawson, R.M.C. (1960) *Biochem. J.*, **75**, 45-53.
-